



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G01N 15/04, B03C 5/02		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/00816
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Januar 2000 (06.01.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/04468		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 28. Juni 1999 (28.06.99)			
(30) Prioritätsdaten: 198 28 919.7 29. Juni 1998 (29.06.98) DE 198 53 658.5 20. November 1998 (20.11.98) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EVOTEC BIOSYSTEMS AG [DE/DE]; Schnackenburgallee 114, D-22525 Hamburg (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FUHR, Günter [DE/DE]; Kavalierstrasse 15, D-13187 Berlin (DE). HAGEDORN, Rolf [DE/DE]; Wartiner Strasse 16, D-13057 Berlin (DE).			
(74) Anwalt: HERTZ, Oliver; V. Bezold & Sozien, Akaemiestrasse 7, D-80700 München (DE).			

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR MANIPULATING PARTICLES IN MICROSYSTEMS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR MANIPULATION VON PARTIKELN IN MIKROSYSTEMEN

(57) Abstract

The invention relates to a method and a device for manipulating particles in a fluidic microsystem (15). The particles are moved in a predetermined reference direction in a suspension liquid. According to the invention, the microsystem (15) is closed at least at the end (17a, 17b) which lies in the reference direction. The particles move under the influence of centrifugal and/or gravitational forces in the suspension liquid which is at rest in relation to the microsystem (15). The centrifugal and/or gravitational forces are essentially parallel to the reference direction. The particles are also exposed to deflection forces in the microsystem (15), the direction of said deflection forces deviating from the reference direction.

(57) Zusammenfassung

Zur Manipulation von Partikeln in einem fluidischen Mikrosystem (15), bei dem die Partikel in einer Suspensionsflüssigkeit in einer vorbestimmten Bezugsrichtung bewegt werden, wird das Mikrosystem (15) mindestens an seinem in der Bezugsrichtung liegenden Ende (17a, 17b) verschlossen. Die Partikel bewegen sich unter der Wirkung von Zentrifugal- und/oder Gravitationskräften in der in Bezug auf das Mikrosystem (15) ruhenden Suspensionsflüssigkeit, wobei die Zentrifugal- und/oder Gravitationskräfte im wesentlichen parallel zu der Bezugsrichtung verlaufen. Außerdem sind die Partikel im Mikrosystem (15) Ablenkkraften ausgesetzt, deren Richtung von der Bezugsrichtung abweicht.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauritanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren und Vorrichtung zur Manipulation
von Partikeln in Mikrosystemen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Manipulation von Partikeln in fluidischen Mikrosystemen, insbesondere zur Bewegung von Partikeln in Mikrosystemen entlang vorbestimmter, zumindest abschnittsweise gerader Bahnen, und Vorrichtungen zur Implementierung eines derartigen Verfahrens, insbesondere ein fluidisches Mikrosystem, bei dem synthetische oder biologische Partikel in einer Suspensionsflüssigkeit manipuliert werden, und Anwendungen eines derartigen Mikrosystems.

Fluidische Mikrosysteme mit flüssigkeitsdurchströmten Strukturen (z.B. Kanälen), in denen Mikroelektroden zur Beeinflussung von Partikeln (z.B. biologische Zellen) in den durchströmten Kanälen durch hochfrequente Felder auf der Basis negativer oder positiver Dielekrophorese angebracht sind, werden beispielsweise in der Publikation von G. Fuhr et al. in "Naturwissenschaften" (Bd. 81, 1994, S. 528 ff.) beschrieben.

Gewöhnlich werden fluidische Mikrosysteme von einer Flüssigkeit zum Vortrieb der Partikel durchströmt. Die auf beiden Kanallängsseiten (oben, unten) aufgebrachten Mikroelektroden führen zu einer Kompartimentierung des Kanals mittels hochfrequenter elektrischer Felder, mit denen die suspendierten Partikel in der gewünschten Weise, z.B. über Verzweigungen in Nachbarkanäle oder andere Strukturelemente, abgelenkt werden können. Schwierigkeiten bereiten vor allem die Einspülungen der Partikel jeweils an einem Kanalende und die Einstellung der in der Regel geringen Strömungsgeschwindigkeiten (einige $\mu\text{l/h}$), die mit steigender Miniaturisierung immer gravierende Einschränkungen mit sich bringen.

Ein genereller Nachteil herkömmlicher fluidischer Mikrosysteme besteht darin, daß zur gerichteten und einstellbaren Partikelbewegung eine Lösungsströmung erforderlich ist, deren Steuerung (z.B. der Strömungsgeschwindigkeit) Probleme bereitet.

Aus der Publikation von M. J. Madou et al. in "SPIE", Band 3259, 1998, S. 80 ff., ist ein Zentrifugal-Durchflußsystem bekannt, bei dem Flüssigkeitsströmungen in einem Mikrosystem nicht mit herkömmlichen Pumpen und Ventilen, sondern unter der Wirkung von Zentrifugalkräften eingestellt werden. Hierzu befindet sich das Mikrosystem in einem scheibenförmigen Träger in Gestalt einer CD-ROM-Scheibe. Analog zum Betrieb von CD-Speichermedien ist der Träger dazu vorgesehen, mit hoher Geschwindigkeit (im Bereich von 100 bis 10000 Umdrehungen pro Minute) gedreht zu werden. Die Flüssigkeiten im Mikrosystem bewegen sich unter der Wirkung der Zentrifugalkräfte radial nach außen. Simultan zu dieser Flüssigkeitsbewegung erfolgen im Mikrosystem bestimmte biochemische Reaktionen. Es ist auch vorgesehen, die Flüssigkeitsbewegung zum Teilchentransport, wie in einer herkömmlich gepumpten Flüssigkeitsströmung zu verwenden.

Die Zentrifugaltechnik nach M. J. Madou et al. besitzt die folgenden Nachteile. Sowohl die Erzielung einer genügenden Flüssigkeitsbewegung als auch eine möglichst behinderungsfreie Mitnahme von Partikeln mit der Flüssigkeit im scheibenförmigen, ebenen Rotor erfordern zwangsläufig die genannten hohen Drehzahlen des Trägers. Dadurch ergibt sich eine Einschränkung des herkömmlichen Zentrifugaldurchflußsystems auf bestimmte Grundfunktionen des herkömmlichen Zentrifugierens oder der Erzielung biochemischer Reaktionen. Die obengenannte Mikroelektrodenteknik zur Erzeugung hochfrequenter elektrischer Felder in den Mikrostrukturen ist nicht anwendbar. Ein weiterer Nachteil bezieht sich auf die mit der herkömmlichen Zentrifugaltechnik realisierten Partikelsortierungen und

-zählungen. Diese sind nur möglich, indem Mikrokanäle mit einer Größe hergestellt werden, die der Größe der zu bearbeitenden Teilchen entspricht. Damit ist ein gegebenes Mikrosystem immer auf eine bestimmte Teilchengröße beschränkt. Außerdem kommt es bei der Handhabung von biologischen Partikeln (Zellen, Zellbestandteile) schnell zu Wechselwirkungen zwischen den Partikeln und der Kanalwand, die zu Kanalverstopfungen führen.

Es sind ferner Zentrifugensysteme allgemein bekannt, bei denen das Probenmaterial in der Zentrifuge nicht nur den Zentrifugalkräften, sondern auch zusätzlich z.B. magnetischen oder elektrischen Kräften ausgesetzt werden, um je nach dem Verhältnis der Zentrifugal- und der Zusatzkräfte spezifische Trenneffekte zu erzielen. Diese Zentrifugensysteme sind jedoch nicht zur Manipulierung biologischer Objekte verwendbar. Biologische Objekte (z.B. Zellen) werden nämlich in relativ stark leitfähigen Lösungen oder Suspensionen (Leitfähigkeiten im Bereich rd. 0.5 bis 3 Siemens/m) gehandhabt. Bei derartigen Leitfähigkeiten würde es in den herkömmlichen Zentrifugensystemen mit relativ großen Elektrodenflächen zu unerwünschten Aufheizungerscheinungen kommen. Die herkömmlichen Zentrifugensysteme sind daher auf Leitfähigkeiten von rd. 0.1 Siemens/m beschränkt.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein verbessertes Verfahren zur Manipulation von Partikeln in fluidischen Mikrosystemen anzugeben, mit dem die Nachteile herkömmlicher Mikrosysteme überwunden werden und das einen erweiterten Anwendungsbereich besitzt. Die Aufgabe der Erfindung ist es ferner, ein verbessertes fluidisches Mikrosystem mit einer gerichteten Partikelbewegung anzugeben, die vereinfacht und mit hoher Genauigkeit einstellbar ist. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, Anwendungen eines derart verbesserten Mikrosystems anzugeben.

Diese Aufgaben werden durch Verfahren und Vorrichtungen mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1 bzw. 10 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Anwendung der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Ein erster wichtiger Gesichtspunkt der Erfindung besteht darin, abweichend vom herkömmlichen Zentrifugaldurchflußsystem mit bewegten Flüssigkeiten zu einer Verfahrensweise überzugehen, bei der in einem fluidischen Mikrosystem unter der Wirkung von Zentrifugalkräften ausschließlich die zu manipulierenden Partikel bewegt werden, wobei im wesentlichen keine Flüssigkeitsströmungen oder -bewegungen im Mikrosystem auftreten. Hierzu werden eine Reihe von Maßnahmen realisiert, die insbesondere die Verwendung eines zumindest einseitig geschlossenen fluidischen Mikrosystems, die Anbringung eines solchen Mikrosystems an einer Schwingrotor-Zentrifugeneinrichtung und den Betrieb dieser Zentrifugeneinrichtung mit einer vorbestimmten Drehzahl umfassen, bei der sich die Partikel im Mikrosystem in gewünschter Weise bewegen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht Zentrifugierungsvorgänge mit geringen Drehzahlen. Wegen der Verwendung eines Schwingrotorsystems, bei dem sich ein Rotor als Träger für das Mikrosystem von einer vertikalen Ausrichtung (bei Stillstand oder niedrigen Drehzahlen) zu einer horizontalen Ausrichtung (bei hohen Drehzahlen) aufrichtet, beeinflussen bei abnehmenden Drehzahlen zunehmend auch die Gravitationskraft die Bewegung der Partikel im Mikrosystem. Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der Erfindung wird auch eine Partikelbewegung in mindestens einseitig geschlossenen Mikrosystemen beschrieben, die sich im Stillstand mit vertikaler Ausrichtung des Mikrosystems befinden. Die Partikelbewegung erfolgt als Sedimentation unter Wirkung der Gravitationskraft.

Erfindungsgemäß werden insbesondere derartige Mikrosysteme, die mit Mikroelektrodeneinrichtungen zur dielektrophoretischen Beeinflussung der Partikelbewegung ausgestattet sind, mit dem Prinzip des Zentrifugierens kombiniert. Die suspendierten Partikel bewegen sich aufgrund der Zentrifugalkräfte durch die Mikrokanäle oder andere Mikrostrukturen in einem Mikrosystem, in denen sie (ohne austreten zu können) unter Wirkung elektrischer Polarisationskräfte z.B. aufgetrennt, in eine vorher festgelegte Position gebracht, fusioniert, sortiert oder permeiert werden.

Ein wichtiger Vorteil der Erfindung besteht darin, daß erstmalig bei komplex strukturierten Mikrosystemen mit dielektrophoretischer Teilchenbeeinflussung auf den Einsatz von schwer steuerbaren und störanfälligen Pumpen oder Ventilen verzichtet werden kann, ohne daß eine Einschränkung der Funktionalität des Mikrosystems auftritt. Es bestehen keine Beschränkungen in Bezug auf die Kanalquerdimensionen. Es besteht die Möglichkeit, das Mikrosystem simultan mit der zugehörigen Steuerelektronik in Rotation zu versetzen. Wechselwirkungen von Partikeln (insbesondere biologischen Partikeln) mit Wandbereichen des Mikrosystems können ohne weiteres vermieden oder aber auch bei entsprechender Strukturierung zur Untersuchung von Bindungsvorgängen in vorbestimmter Weise erzielt werden.

Ein wichtiger Vorteil der Erfindung besteht darin, daß alle Partikel gleichermaßen der Zentrifugalkraft ausgesetzt werden und sich entsprechend einer Bezugsrichtung entlang vorbestimmter Kanäle bewegen und die Trennung z. B. in verschiedene Teilkanäle oder Reservoirs ausschließlich über Ablenkkräfte erzielt wird, die unabhängig von der Zentrifugalkraft partikelspezifisch wirken. Die Ablenkkräfte besitzen eine von der Bezugsrichtung abweichende Richtung, wobei der Winkelunterschied vorzugsweise kleiner als 90° ist. Über die Zentrifugalkraft wird lediglich die Partikelgeschwindigkeit eingestellt.

Nach der Trennung können die Zusatzkräfte abgeschaltet werden, ohne das sich die Partikel wieder vermengen. Es ist ein unerwartetes und wichtiges Merkmal, daß durch den Einsatz einer Schwingrotorzentrifuge der Kontakt von Partikeln mit Probenkammerwandungen vermieden werden kann, was besonders bei biologischen Objekten von Bedeutung ist.

Einzelheiten und weitere Vorteile der Erfindung werden im folgenden unter Bezug auf die beigefügten Zeichnungen beschrieben. Es zeigen:

- Fig. 1 eine schematische Perspektivansicht eines erfindungsgemäßen Aufbaus einer Zentrifuge mit einem Mikrosystem,
- Fig. 2 eine schematische Draufsicht auf ein erfindungsgemäßes Mikrosystem, das zur Teilchentrennung eingerichtet ist, und
- Fig. 3 eine schematische Draufsicht auf ein programmierbares Beladungsmikrosystem gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung.

Die hier beschriebenen Ausführungsformen der Erfindung beziehen sich auf die Kombination eines Mikrosystems, das mit einer Mikroelektrodeneinrichtung zur Ausübung negativer oder positiver Dielektrophorese ausgestattet ist (dielektrophoretisches Mikrosystem), mit einer Schwingrotorzentrifugeneinrichtung. Sowohl das dielektrophoretische Mikrosystem (abgesehen von der mindestens einseitigen Verschließbarkeit von Kanalstrukturen) als auch die Schwingrotorzentrifugeneinrichtung sind jeweils an sich bekannt, so daß auf deren technische Einzelheiten hier nicht weiter eingegangen wird. Es wird betont, daß der Begriff der Schwingrotorzentrifugeneinrichtung hier auch im weitesten Sinne dahingehend zu verstehen ist, daß jede Zentrifugenein-

richtung mit mindestens einem drehzahlabhängig aufrichtbaren Rotor eingeschlossen ist, der selbst das Mikrosystem und die zugehörige Steuerung bildet, in den das Mikrosystem und die zugehörige Steuerung integriert oder auf den das Mikrosystem und die zugehörige Steuerung aufgesetzt sind.

Die erfindungsgemäß manipulierten Partikel können synthetische Teilchen oder biologische Objekte umfassen. Die synthetischen Teilchen sind beispielsweise membranumhüllte Gebilde, wie Liposomen oder Vesikeln, oder sogenannte Beads oder auch Makromoleküle. Die biologischen Objekte umfassen beispielsweise biologische Zellen oder Bestandteile von diesen (z.B. Zellorganellen), Bakterien oder Viren. Die Partikel können auch Aggregate oder Zusammenballungen derartiger Teilchen und/oder Objekte sein. Die Erfindung wird vorzugsweise mit zellphysiologisch oder medizinisch relevanten Fluiden mit Leitfähigkeiten unterhalb 5 Siemens/m implementiert.

Fig. 1 ist eine schematische Übersichtsdarstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Illustration der Anbringung eines dielektrophoretischen Systems an einer Zentrifugeneinrichtung.

An einem üblichen oder anwendungsabhängig modifizierten Rotor einer Zentrifuge mit der Drehachse 11 befinden sich vier Aufnahmen 12, in die jeweils paßgerecht und für die applizierten Drehzahlen entsprechend ein Mikrosystem 15 und eine Steuerelektronik 13 zur Ansteuerung des Mikrosystems mit hochfrequenten Wechsignalen verschiedener Phasenlage und Amplitude eingesetzt sind. Die Steuerelektronik ist über Kabel 14, Stecker oder anderweitig mit dem Mikrosystem 15 verbunden. Die Energieversorgung der Steuereinrichtung erfolgt vorzugsweise über eine elektrische Verbindung, (umlaufender Kontakt) mit dem festen Laborsystem. Das Mikrosystem hat ein Eingangsdepot 16, das anwendungsabhängig verschieden groß ausgelegt sein

kann und vor der Zentrifugation mit einer Teilchen- oder Zellsuspension gefüllt wird. Vom Eingangsdepot 16 aus verläuft eine Kanalstruktur, deren Einzelheiten weiter unten erläutert werden, bis zu Auffangzonen 17a, 17b, die ein zumindest während des Zentrifugierens geschlossenes Ende des Mikrosystems 15 bilden. Dies bedeutet, daß das Ende des Mikrosystems entweder dauerhaft abgeschlossen oder bei Stillstand der Vorrichtung durch entsprechende Verbindungselemente geöffnet und an vorbestimmte Zusatzsysteme zur Probenübertragung angeschlossen werden kann. Das Mikrosystem 15 ist so auf der Aufnahme 12 angeordnet, daß bei Betrieb der Zentrifugeneinrichtung (Drehung des Rotors um die Drehachse 11 mit der Drehfrequenz ω) die auf das Mikrosystem 15 und in diesem befindliche Partikel wirkenden Zentrifugalkräfte in der Bezugsrichtung vom Eingangsdepot 18 hin zu den Auffangzonen 17a, 17b gerichtet sind. Die Aufnahmen 12 sind verschwenkbar am Rotor (nicht dargestellt) angebracht. Beim Stillstand der Zentrifuge sind die Aufnahme 12 im wesentlichen vertikal oder mit einem geringen Winkel gegenüber der Drehachse ausgerichtet. Beim Zentrifugenebetrieb richten sich die Aufnahmen 12 drehzahlabhängig in einen größeren Winkel bis hin in die horizontale Ausrichtung senkrecht zur Drehachse 11 auf. Unter der Wirkung der Gravitationskraft (bei Stillstand der Zentrifuge) bzw. der Zentrifugalkräfte durchlaufen die Teilchen das elektronisch gesteuerte Mikrokanalsystem und sammeln sich in den Auffangzonen (z.B. am geschlossenen Ende des von der Rotorachse wegweisenden Teils des Mikrosystems).

Bei diesem Durchlauf werden die Partikel nach vorbestimmten Programmen (s. unten) behandelt. Da die Teilchen in Abhängigkeit von ihrer Dichte verschiedene Bewegungen ausführen und Endpositionen einnehmen, wird in der vorliegenden Erfindung der Vorteil der Zentrifugaltrennung und -bewegung mit den Möglichkeiten der programmierbaren Dielektrophorese kombiniert. In der Regel wird negative Dielektrophorese, in Ausnahmefällen

auch positive Dielektrophorese der Teilchen genutzt. Ein weiterer Vorteil der Erfindung ist die Steuerung der Teilchenbewegung über die Rotationsgeschwindigkeit (ω) des Rotors 11. Da hierbei ebenfalls programmierbare Variationen durchlaufen werden können, ist ein zweiter Komplex von festlegbaren Parametern bei der Partikelmanipulation gegeben.

Die Zentrifugeneinrichtung ist mit einer (nicht dargestellten) Drehzahlsteuerung versehen, die für eine reproduzierbare und genaue Drehzahleinstellung insbesondere in niedrigen Drehzahlbereichen eingerichtet ist. Die Drehzahl wird anwendungsabhängig je nach der gewünschten Geschwindigkeit der zu manipulierenden Teilchen und in Abhängigkeit vom konkreten Zentrifugenaufbau gewählt. Die interessierenden Partikelgeschwindigkeiten liegen für biologische Partikel (z.B. Zellen) unterhalb von rd. 500 $\mu\text{m/s}$ (vorzugsweise im Bereich von 50 bis 100 $\mu\text{m/s}$) und für synthetische Partikel (z.B. Latex-Beads) bei höheren Geschwindigkeiten (z.B. einige mm/s). Die Drehzahl der Zentrifugeneinrichtung wird entsprechend den Zusammenhängen von Drehzahl und Zentrifugalkraft in Abhängigkeit von der Größe bzw. Massendichte der Partikel gewählt. Die folgenden Angaben beziehen sich auf einen Abstand des Mikrosystems von der Rotorachse im Bereich von 1 bis 10 cm. Für Partikeldurchmesser im Bereich von 50 bis 600 nm (z.B. Viren) können die Drehzahlen beispielsweise im Bereich von 1 bis 1000 U/min liegen. Bei Partikeln mit einem Durchmesser von rd. 5 μm werden Drehzahlen bis zu 100 U/min bevorzugt, wobei jedoch auch höhere Drehzahlen einstellbar sind. Bei besonders kleinen Partikeln, z.B. Makromoleküle sind auch noch höhere Drehzahlen realisierbar. Für biologische Zellen ergeben sich bei einem Abstand des Mikrosystems von rd. 5 bis 10 cm von der Drehachse 11 Drehzahlen im Bereich von wenigen Umdrehungen pro Minute bis zu einigen 100 (z. B. 600) Umdrehungen pro Minute, vorzugsweise unterhalb 100 U/min. Die erzielbaren Zentrifugalkräfte liegen im Bereich von pN bis nN. Die Zentrifugeneinrichtung ist jedoch

auch für größere Drehzahlen ausgelegt, die insbesondere für kleine Partikel oder für Reinigungs- oder Spülzwecke eingestellt werden können. Diese erhöhten Drehzahlen können bis zum Bereich der Drehzahlen herkömmlicher Laborzentrifugen reichen.

Die Drehzahl der Zentrifuge wird auch in Abhängigkeit von den dielektrophoretischen Kräften ausgewählt, die auf die Partikel im Mikrosystem wirken. Die dielektrophoretischen Kräfte sind als Polarisationskräfte von der Teilchenart und -größe abhängig. Die Drehzahl wird vorzugsweise so ausgewählt, daß die Zentrifugalkräfte auf die Partikel kleiner oder gleich den dielektrophoretischen Kräften sind. Falls diese nicht bekannt sind, kann die Drehzahl auch in Bezug auf das folgende Kriterium ausgewählt werden. Die Teilchen müssen sich so langsam durch die Kanalstruktur bewegen, daß beim Vorbeitritt an den Mikroelektrodeneinrichtungen genügend Zeit zur dielektrophoretischen Ablenkung bleibt. Die Wirksamkeit oder Unwirksamkeit der dielektrophoretischen Ablenkung in Abhängigkeit von der Drehzahl kann mit geeigneten Sensoren optisch oder elektrisch erfaßt werden.

Fig. 2 zeigt in schematischer Weise ein Mikrosystem zur Auftrennung eines Partikelgemisches, bestehend aus größeren Teilchen 21 (z.B. Zellen) und kleinen Teilchen 22, die in einer Suspension vorliegen. Die Zentrifugalkräfte wirken in Pfeilrichtung 23 (Bezugsrichtung). Die typischen Abmessungen der Kanalstruktur 24 sind die folgenden:

Breite:	einige 10 μm bis zu einigen mm (typischerweise: 200 - 400 μm)
Länge:	einige mm bis zu einigen cm (typischerweise: 20 - 50 mm)
Höhe:	einige μm bis zu einigen 100 μm (typischerweise: 50 μm)

Auf der Oberseite 25 und Unterseite 26 des Kanals 24 sind Mikroelektroden 27a, 27b gegenüberliegend angeordnet, die bei Ansteuerung mit einer Wechselspannung (in der Regel einer Frequenz im MHz-Bereich und einer Amplitude von einigen Volt) quer zum Kanal Feldbarrieren erzeugen, die über negative (bedingt auch positive) Dielektrophorese die Teilchen ablenken (im hier gezeigten Fall die großen Teilchen).

Die Kanalstruktur 24 reicht vom Eingangsdepot 28 zu den geschlossenen Kanalenden 29a, 29b, in die sich der in einem mittleren Abschnitt gerade Kanal verzweigt. Ein erstes Paar der Mikroelektroden 27a, 27b ist unmittelbar am kanalseitigen Ende des Eingangsdepots 28 zur Ausbildung einer Feldbarriere angeordnet, die schräg in den Kanal hineinragt und die Aufgabe besitzt, die großen Teilchen 21 in den in Draufsicht rechten Teil des Kanals 24 zu drängen. Ein zweites Paar der Mikroelektroden 27a, 27b ist unmittelbar vor der Verzweigung zu den Kanalenden 29a, 29b angeordnet und bildet eine Feldbarriere, die schräg über die Kanalbreite bis in die zum Kanalende 29b führende Abzweigung reicht und dazu vorgesehen ist, die großen Teilchen 21 zu diesem Kanalende hin zu führen.

Ein erfindungsgemäßes Manipulationsverfahren, das bei diesem Beispiel auf eine Trennung der Teilchen gerichtet ist, umfaßt die folgenden Schritte.

Vor der Zentrifugation wird das Mikrosystem mit einer geeigneten Flüssigkeit gefüllt. Dabei ist das Mikrosystem bereits in eine Aufnahme 12 der Zentrifuge (s. Fig. 1) eingebaut. Der Einbau kann aber auch nach der Befüllung des Mikrosystems erfolgen. Kurz vor Beginn der Zentrifugation werden die Elektroden 27a, 27b angesteuert und im Eingangsdepot 28 wird z.B. mit einer Pipettiereinrichtung die Suspension der zu trennenden Teilchen zugegeben. Die Zentrifugeneinrichtung ist zunächst noch im Ruhezustand, d.h. das Mikrosystem ist vertikal oder

zur Vertikalen leicht geneigt ausgerichtet. Die Gravitationskraft, die auf die Teilchen wirkt, führt zu einem masseabhängig verschieden schnellen Absinken in die Kanalstruktur (Sedimentation). Die weitere Bewegung der Teilchen hin zu den Kanalenden erfolgt je nach der gewünschten Teilchengeschwindigkeit ausschließlich unter der Wirkung der Gravitationskraft oder unter der gemeinsamen Wirkung der Gravitationskraft und der Zentrifugalkräfte. Die Zentrifugation kann somit als Sedimentation unter der Wirkung einer künstlich erhöhten Fallbeschleunigung aufgefaßt werden. Die sich bewegenden Teilchen werden durch das elektrische Feld des ersten Paares der Mikroelektroden größenabhängig getrennt.

Die Darstellung in Fig. 2 zeigt die Verhältnisse während der Sedimentation bzw. Zentrifugation. Durch die exakt einstellbaren Zentrifugalkräfte über die Rotationsgeschwindigkeit bewegen sich die Teilchen in den unteren Teil des Mikrosystems. Entsprechend der üblichen Zentrifugationsprinzipien sedimentieren die Teilchen mit der größten Dichte zuerst. Da die Teilchen 21 durch die elektrische Feldbarriere im Kanal nach rechts verschoben werden, während die Teilchen 22 davon unbeeinflusst bleiben, so ergibt sich in den Kanalenden 29a, 29b eine Trennung beider Teilchenarten. Die Teilchen in jedem der Kanalenden ordnen sich zusätzlich wie bei der üblichen Zentrifugation entsprechend ihrer Dichte an. Das dargestellte Mikrosystem kann als Grundform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung betrachtet werden, wobei diese Grundform anwendungsabhängig vergrößert, erweitert oder mit weiteren Mikrostrukturen kombiniert werden kann. Der Vorteil besteht darin, daß keine Lösungsströmung entsteht und dennoch die Partikelbewegung gerichtet und einstellbar ist. Derartige Systeme können auch entgegengesetzte Bewegungen erzeugen, wenn die Teilchen einen Auftrieb besitzen.

Ausgehend von der dargestellten Grundform kann ein erfindungsgemäßes Mikrosystem beliebig erweitert werden, wie es an sich von den dielektrophoretischen Mikrosystemen bekannt ist. Demnach kann die Kanalstruktur insbesondere mehrere, über Verzweigungen miteinander verbundene Einzelkanäle aufweisen. Die Kanäle können gerade oder gekrümmt sein. Gekrümmte Kanalformen (z.B. Bögen, Mäander, Biegungen, Winkel usw.) können insbesondere zur Untersuchung von Bindungsunterschieden von Partikeln mit den Kanalwänden verwendet werden.

Gemäß einer weiteren Modifikation kann das Mikrosystem an der Aufnahme 12 (s. Fig. 1) drehbar angebracht sein. Während eines ersten Zentrifugationsvorganges erfolgt in einer ersten Mikrosystemorientierung z.B. eine Teilchentrennung gemäß Fig. 2. Anschließend wird die Orientierung des Mikrosystems um 180° verändert, so daß die Gravitations- und/oder Zentrifugalkräfte entgegengesetzt der Pfeilrichtung 23 wirken. Die Kanalenden 29a, 29b übernehmen dann die Funktion von Eingangsdepots, von denen bei Vorhandensein geeigneter Kanalstrukturen (zusätzliche seitliche Abzweigungen) eine weitere Verteilung der getrennten Teilchen in Untergruppen oder eine bestimmte Behandlung (Beladen mit Stoffen, Elektroporation u. dgl.) erfolgen kann. Es sind auch in Abhängigkeit von der Kanalstruktur andere Orientierungsänderungen als die genannte 180° -Umkehr möglich. Es besteht ferner die Möglichkeit, die Aufnahme 12 so zu gestalten, daß das Mikrosystem während der Zentrifugation gedreht wird.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung, nämlich ein programmierbares Beladungsmikrosystem für Zellen oder Teilchen ist in Fig. 3 gezeigt. Hier ist der Zentrifugationskanal in drei Teile 31a, 31b, 31c unterteilt. In den Zwischenwänden befinden sich Öffnungen 32, durch die wieder Elektroden 33 auf der Ober- und Unterseite des Kanals hindurchreichen. Die Öffnungen sind der Teilchengröße angepaßt (typischerweise 5- bis

20-fach größer als der Durchmesser). Zu Beginn werden in jeden der Kanalteile 31a bis 31c verschiedene Lösungen eingefüllt, die der chemischen Veränderung oder Beladung der Partikel dienen. Danach werden in einen Kanalteil (hier z.B. 31c) die Teilchen eingefügt. Durch die Zentrifugation gelangen die Teilchen (z.B. zuerst die schwarzen, dann die hellen) an die Elektroden 33 und können so automatisch über die elektrischen Feldbarrieren durch die Öffnungen 32 in die Nachbarlösungen überführt werden.

Auch hier kommt es zu einer Sortierung in den drei Kanalenden 31d, 31e, 31f und gleichzeitig zu einer Anordnung der Teilchen entsprechend der Masseunterschiede.

Weitere Eigenschaften der Mikrosysteme bestehen darin, daß sie Öffnungen (Zuflüsse, Durchflüsse, Abflüsse) besitzen können, die sich verschließen lassen, so daß die Teilchen nach der Zentrifugation oder davor leicht entnommen oder eingefügt werden können. Ferner können all die Mikroelektroden-elemente (Halteelektroden für Teilchen, Mikrofeldkäfige etc.) eingebaut werden, die für die dielektrophoretische Beeinflussung von Teilchen an sich bekannt sind und bei herkömmlichen Mikrosystemen, die mit strömenden Flüssigkeiten arbeiten, eingesetzt werden. Aufgrund des Zusammenwirkens der Gravitations- bzw. Zentrifugalkräfte mit den dielektrophoretischen Kräften ist das erfindungsgemäße Verfahren eine elektrisch gesteuerte oder aktive Zentrifugation. Zusätzlich können Kombinationen mit der Einwirkung optischer Kräfte (Laser-Tweezer), magnetischer Kräfte (Einwirkung auf magnetische Partikel) oder mechanischer Kräfte in Form von Ultraschallkräften vorgesehen sein.

Anwendungsgebiete der Erfindung sind insbesondere:

- Zelltrennung/-fraktionierung,
- Zellsortierung,

- Zellbeladung (molekular, Nanoteilchen, Beads),
- Zellentladung (molekular),
- Zellpermeation (sog. Elektroporation),
- Zellfusion (sog. Elektrofusion),
- Zellpärchenbildung, und
- Zellaggregatbildung.

Die Erfindung ist nicht auf bestimmte Lösungs- oder Suspensionsflüssigkeiten beschränkt. Es ist vorteilhaft, wenn die Viskosität der im Mikrosystem enthaltenen Flüssigkeit bekannt ist. Bei bekannter Viskosität läßt sich die Drehzahl zur Einstellung einer bestimmten Partikelgeschwindigkeit auf der Grundlage von Tabellenwerten oder durch einen Programmalgorithmus ermitteln. Alternativ ist es jedoch auch möglich, die tatsächliche Geschwindigkeit der Partikel im Mikrosystem während der Zentrifugation zu erfassen (z.B. mit einem optischen Sensor) und die Drehzahl zur Einstellung einer bestimmten Partikelgeschwindigkeit zu regeln. Es kann vorgesehen sein, daß in verschiedenen Teilbereichen des Kanalstrukturen, z.B. in parallel verlaufenden Kanälen, die nur über eine Öffnung miteinander verbunden sind, Flüssigkeiten mit verschiedenen Viskositäten enthalten sind. In diesem Fall werden jedoch Viskositäten bevorzugt, bei denen sichergestellt ist, daß die Diffusion der Flüssigkeiten durch die Öffnung über den Zentrifugationszeitraum verhältnismäßig klein oder vernachlässigbar klein ist.

Falls die Massendichte der Partikel kleiner als die Flüssigkeit im Mikrosystem ist, kann die Erfindung entsprechend abgewandelt implementiert werden, indem Partikel gegebenenfalls auf der der Drehachse abgewandten Seite des Mikrosystems eingebracht werden und unter Wirkung des Auftriebs oder unter kombinierter Wirkung des Auftriebs und der Zentrifugalkräfte zum anderen Ende des Mikrosystems wandern.

Das Mikrosystem wird anwendungsabhängig in Bezug auf die Kanalstruktur und die Ausrichtung der Elektrodeneinrichtungen angepaßt. Die Kanalquerdimensionen sind in der Regel wesentlich größer als die Durchmesser der einzelnen Partikel. Dadurch wird vorteilhafterweise ein Verstopfen der Kanäle vermieden. Sind lediglich Partikel mit besonders geringen Dimensionen zu manipulieren (z.B. Bakterien oder Viren oder Zellorganellen), so können die Kanaldimensionen entsprechend verringert werden, z.B. auf Beträge unterhalb 10 μm .

Die Erfindung wird mit einem Mikrosystem implementiert, das mindestens einseitig geschlossen ist. Das geschlossene Ende kann ein geschlossenes Kanalende, eine geschlossene Sammelzone oder auch ein geschlossener Hohlraum im Mikrosystem sein. Bei der erfindungsgemäßen Partikelmanipulation erfolgt im wesentlichen keine Flüssigkeitsbewegung hin zu dem geschlossenen Ende. Dies bedeutet, insbesondere bei Realisierung von Sammelzonen oder Hohlräumen am geschlossenen Ende, daß diese wie das gesamte Mikrosystem zu Beginn der Partikelmanipulation mit der Lösung oder Suspension für die Teilchen gefüllt ist.

Falls es beim Manipulieren der Partikel zu Zusammenballungen oder vorübergehenden Verstopfungen der Kanalstrukturen kommt, so ist erfindungsgemäß vorgesehen, die Drehzahl der Zentrifuge kurzzeitig zu erhöhen, um so die zusammenhaftenden Partikel abzulösen und weiter zu bewegen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Manipulation von Partikeln in einem fluidischen Mikrosystem (15, 24, 31), bei dem die Partikel (21, 22) in einer Suspensionsflüssigkeit in einer vorbestimmten Bezugsrichtung bewegt werden,

dadurch gekennzeichnet, daß

das Mikrosystem (15, 24, 31) mindestens an seinem in der Bezugsrichtung liegenden Ende (17a, 17b, 29a, 29b, 31d, 31e, 31f) verschlossen wird,

die Partikel sich mit einer durch vorbestimmte Zentrifugal- und/oder Gravitationskräfte eingestellten Geschwindigkeit in der in Bezug auf das Mikrosystem (15, 24, 31) ruhenden Suspensionsflüssigkeit bewegen, wobei die Zentrifugal- und/oder Gravitationskräfte im wesentlichen parallel zu der Bezugsrichtung verlaufen, und

die Partikel im Mikrosystem (15, 24, 31) Ablenkkräften ausgesetzt werden, deren Richtung von der Bezugsrichtung abweicht.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem das Mikrosystem (15, 24, 31) an einer Schwingrotorzentrifugeneinrichtung angebracht ist, wobei die Partikelbewegung bei Stillstand der Schwingrotorzentrifugeneinrichtung als Sedimentation unter Wirkung der Gravitationskraft und bei Betrieb der Schwingrotorzentrifugeneinrichtung unter Wirkung der Zentrifugalkräfte erfolgt.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem die Ablenkkräfte elektrische Polarisationskräfte, optische Kräfte, magnetische Kräfte oder Ultraschallkräfte umfassen.

4. Verfahren gemäß Anspruch 3, bei dem die Drehzahl der Schwingrotorzentrifugeneinrichtung so eingestellt ist, daß die

auf die Partikel wirkenden Zentrifugalkräfte kleiner oder gleich als die Ablenkkräfte sind.

5. Verfahren gemäß Anspruch 3, bei dem die Drehzahl der Schwingrotorzentrifugeneinrichtung so eingestellt ist, daß sich die Partikel so langsam bewegen, daß unter Wirkung der Ablenkkräfte eine Ablenkung der Partikel aus der Bezugsrichtung erfolgt.

6. Verfahren gemäß Anspruch 3, bei dem die Drehzahl der Schwingrotorzentrifugeneinrichtung in Abhängigkeit von der mit einem optischen oder elektrischen Sensor erfaßten Geschwindigkeit der Partikel geregelt wird.

7. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem mehrere Partikelbewegungen unter Wirkung der Zentrifugalkräfte in getrennten Zentrifugationsschritten erfolgen, wobei zwischen den Zentrifugationsschritten eine Verstellung des Mikrosystems zur veränderten Ausrichtung in Bezug auf die Zentrifugalkräfte erfolgt.

8. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Drehzahl der Schwingrotorzentrifugeneinrichtung in Abhängigkeit von der Größe oder Dichte der Partikel gewählt wird.

9. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem sich die Partikel unter Wirkung von Auftriebskräften entgegengesetzt zur Richtung der Zentrifugal- und/oder Gravitationskräfte bewegen.

10. Mikrosystem (15, 24, 31) mit mindestens einem Kanal, der von einem Eingangsdepot (16, 28) zu Kanalenden (17a, 17b, 29a, 29b, 31d, 31e, 31f) verläuft,
dadurch gekennzeichnet, daß

das Mikrosystem (15, 24, 31) zur Anbringung am Rotor einer Zentrifuge derart eingerichtet ist, daß beim Zentrifugetrieb die Zentrifugalkräfte, die auf Partikel im Kanal wirken, im wesentlichen parallel zur Kanalausrichtung verlaufen, und die Kanalenden (17a, 17b, 29a, 29b, 31d, 31e, 31f) geschlossen oder während des Zentrifugetriebs verschließbar sind.

11. Mikrosystem gemäß Anspruch 10, das eine Mikroelektroden-einrichtung aufweist, die Mikroelektroden zur Erzeugung von Feldbarrieren im Mikrosystem umfaßt.

12. Mikrosystem gemäß Anspruch 11, bei dem die Mikroelektroden an gegenüberliegenden Längsseiten des Kanals angeordnet und zur Beaufschlagung mit einer hochfrequenten Wechselspannung eingerichtet sind.

13. Mikrosystem gemäß Anspruch 12, bei dem die Mikroelektroden bandförmige Elektroden sind, die sich schräg zur Kanalausrichtung erstrecken und zur Erzeugung von Feldbarrieren im Kanal eingerichtet sind.

14. Mikrosystem gemäß einem der Ansprüche 10 bis 13, das am Rotor der Zentrifuge verschwenkbar angebracht ist.

15. Mikrosystem gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche 10 bis 14, bei dem eine elektronische Steuerung des Mikrosystems am Rotor der Zentrifuge angebracht ist.

16. Verwendung eines Verfahrens oder einer Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche zur Trennung, Fraktionierung, Sortierung, Beladung, Entladung, Permeation, Fusion, Pärchenbildung und/oder Aggregatbildung synthetischer Teilchen und/oder biologischer Partikel.

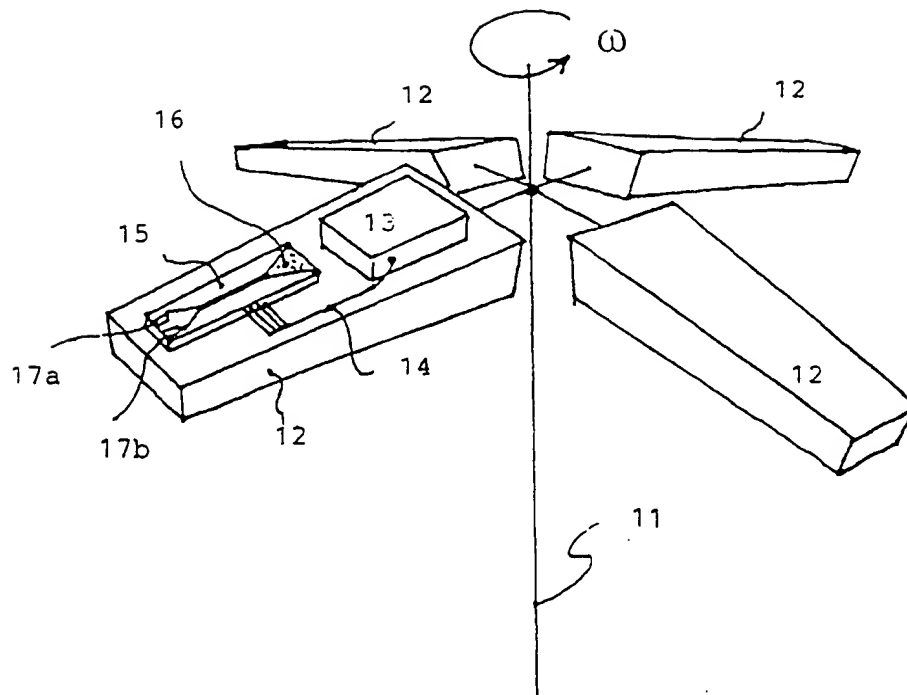


FIG. 1

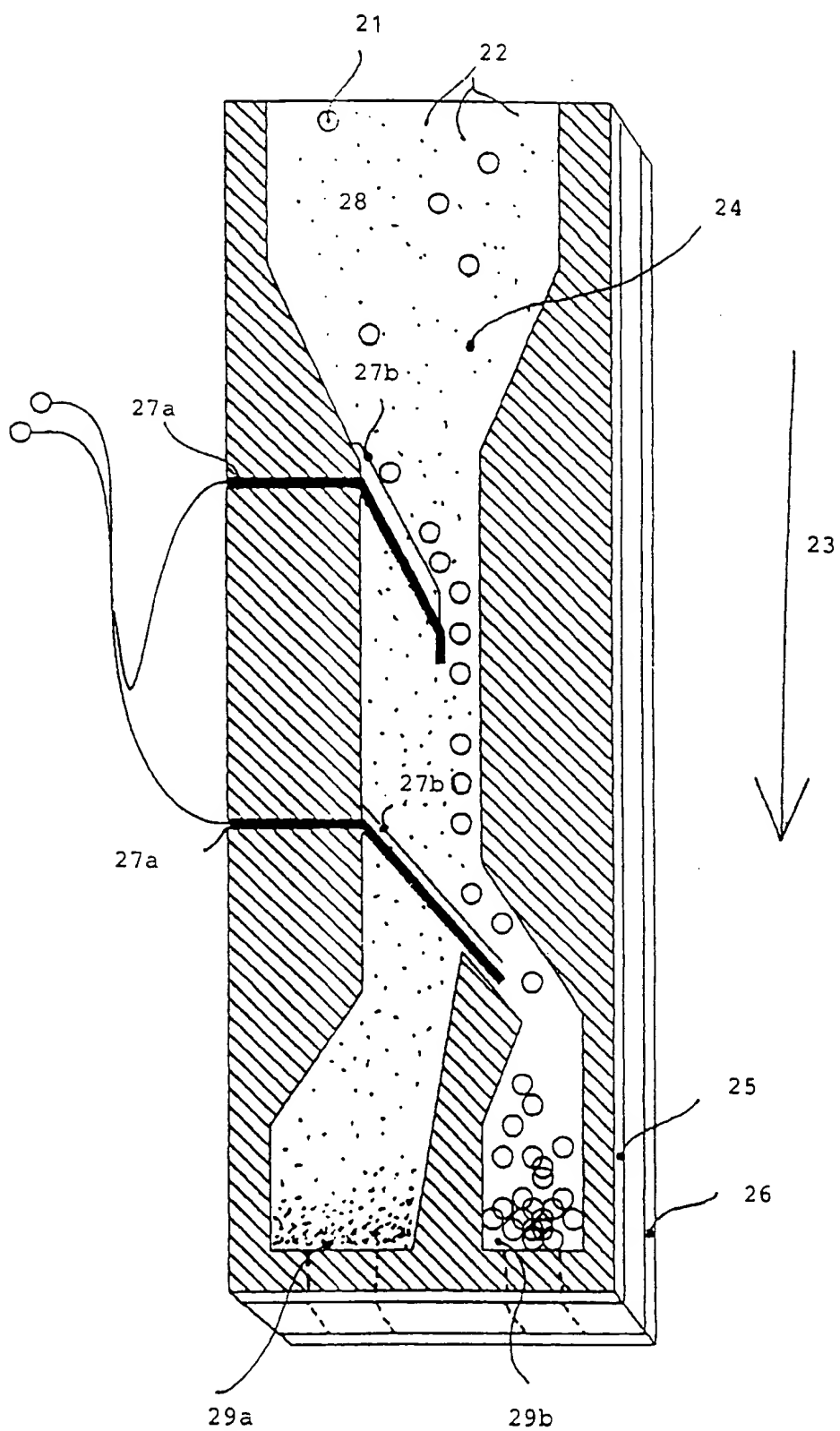


FIG. 2

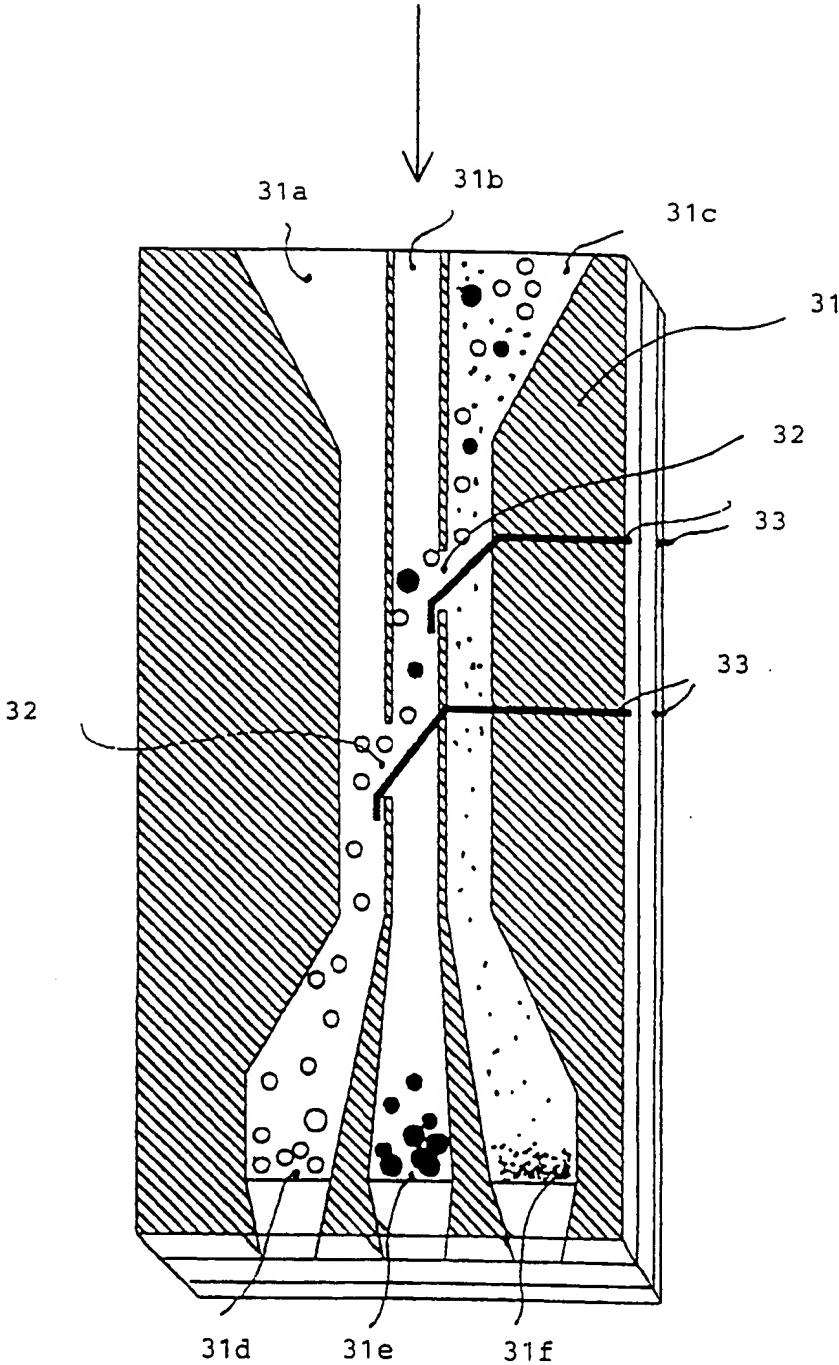


FIG. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/EP 99/04468

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N15/04 B03C5/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 B03C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 4 726 904 A (AYERS WILLIAM M) 23 February 1988 (1988-02-23) column 8, line 40 -column 10, line 38; claims 1,4-7; figures 1,2 ---	1,10,16 2-4,6,8, 11
X A	US 5 565 105 A (THAKOR NITISH V) 15 October 1996 (1996-10-15) column 1, line 23 - line 40 column 4, line 49 -column 6, line 44; claims 1-5; figure 2 ---	1,10,16 2-5,7,8
A	WO 98 10869 A (AGER COLIN DENNIS ;DAMES ANDREW NICHOLAS (GB); SCIENT GENERICS LTD) 19 March 1998 (1998-03-19) page 1, line 1 -page 2, line 2 page 15, line 31 -page 16, line 14; claim 6; figures 6,7 -----	1,10-12, 16

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 September 1999

Date of mailing of the international search report

07/10/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Decanniere, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/04468

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4726904 A	23-02-1988	NONE	
US 5565105 A	15-10-1996	NONE	
WO 9810869 A	19-03-1998	EP 0925115 A	30-06-1999

Form PCT/SA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC1/EP 99/04468

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 G01N15/04 B03C5/02

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 B03C

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X A	US 4 726 904 A (AYERS WILLIAM M) 23. Februar 1988 (1988-02-23) Spalte 8, Zeile 40 - Spalte 10, Zeile 38; Ansprüche 1,4-7; Abbildungen 1,2 ---	1,10,16 2-4,6,8, 11
X A	US 5 565 105 A (THAKOR NITISH V) 15. Oktober 1996 (1996-10-15) Spalte 1, Zeile 23 - Zeile 40 Spalte 4, Zeile 49 - Spalte 6, Zeile 44; Ansprüche 1-5; Abbildung 2 ---	1,10,16 2-5,7,8
A	WO 98 10869 A (AGER COLIN DENNIS ; DAMES ANDREW NICHOLAS (GB); SCIENT. GENERICS LTD) 19. März 1998 (1998-03-19) Seite 1, Zeile 1 - Seite 2, Zeile 2 Seite 15, Zeile 31 - Seite 16, Zeile 14; Anspruch 6; Abbildungen 6,7 -----	1,10-12, 16

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. September 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

07/10/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Decanniere, L

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/04468

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4726904 A	23-02-1988	KEINE	
US 5565105 A	15-10-1996	KEINE	
WO 9810869 A	19-03-1998	EP 0925115 A	30-06-1999

Formblatt PCT/SA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)